

**Immunologisch bedingte Wachstumshemmung
maligner Tumoren**

vorgelegt von
Reinhard Schöfthaler
aus Schwabach

Aus der Abteilung für Klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth

IMMUNOLOGISCH BEDINGTE WACHSTUMSHEMMUNG
MALIGNER TUMOREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Reinhard Schöffthaler
aus Schwabach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. med. dent. A. Kröncke

Referent: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1969

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
VERSUCHSANORDNUNG UND UNTERSUCHUNGSGUT	2
ERGEBNISSE	9
DISKUSSION	19
ZUSAMMENFASSUNG	22
LITERATURVERZEICHNIS	23

A) Einleitung

In Voruntersuchungen am Modell des transplantablen Rattentumors konnte gezeigt werden, daß tumortragende Ratten allein ebenso wie unter verschiedenen zusätzlichen Versuchsanordnungen keine objektivierbare Sensibilisierung durch den transplantablen Tumor erfahren (8, 10, 13, 21). Dagegen scheint eine Iso- oder auch Autosensibilisierung möglich zu werden (16). Diese und andere aus der Humanpathologie bekannt gewordenen Beobachtungen (2, 3, 11, 14, 17) machen es wahrscheinlich, daß in diesen Fällen nur modifiziertes Tumorprotein eine Autosensibilisierung zu induzieren vermag. Die Vorstellungen gehen dabei von den klassischen Landsteinerschen Modellversuchen aus, wonach ein Hapten, d.h. eine ursprünglich proteinfreie Substanz durch Koppelung an Eiweiß Antigencharakter erlangt (12) und sowohl gegen das Hapten als auch gegen das Schleppereiweiß Antikörperbildung induziert. Übertragen auf die vorliegenden Versuche bedeutet dies, daß Tumorprotein an ein definiertes Heteroantigen gekoppelt würde, welches dann in einem fremden Organismus gleichermaßen Antikörper gegen das heterologe Antigen wie auch gegen das homologe bzw. autologe Tumoran-tigen induzieren würde. Als Folge dessen müßte es zumindest zu einer immunologischen Auseinandersetzung am Tumorgewebe i.S. einer Art Autoimmunisierung oder i.S. einer Transplantationsreaktion kommen.

Zu diesem Zwecke wurden in nachfolgenden Versuchen zwei Systeme gewählt, im einen Fall Koppelung von Tumorproteinen an menschliche Erythrozyten, im anderen Koppelung von Kaninchen - γ - Globulin an Tumorzellen durch Bisdiazotierung.

B) Hauptteil

I) Versuchsanordnung und Untersuchungsgut

Es wurden insgesamt 60 Wistar - Ratten (Albinoratten) mit einem jeweiligen Gewicht von durchschnittlich 250 g in Versuch genommen. Von ihnen wurden 20 Tiere (Gruppe Ia) mit einem an menschliche Erythrozyten gekoppelten Homogenat des transplantablen Walker-Carcinoms und 20 Tiere (Gruppe IIa) mit den an Kaninchen- γ -Globulin durch Bisdiazotierung gebundenen Tumorzellen nach folgendem Schema (Abb. 1) behandelt.

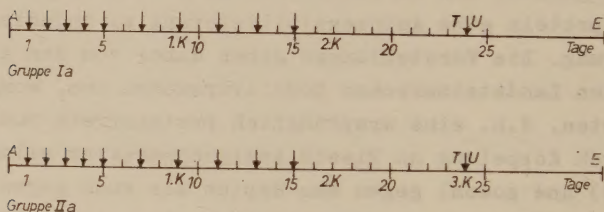


Abb. 1 zeigt eine Übersicht über die Versuchsanordnung mit Applikationsdaten des für die Sensibilisierung verwendeten Tumorantigens ($\downarrow$) sowie Angaben über Tumortransplantation (TU) und Kontrolluntersuchungen.

Jeweils 10 Tiere (Gruppen Ib und IIb) dienten als Kontrolle. Prinzipiell wurde vor Versuchsbeginn, sowie während des Versuches fortlaufend in bestimmten Abständen Blut abgenommen. Diese Blutproben wurden folgenden Bestimmungen unterworfen: 1) Papierelektrophorese, 2) Agar- und Immunoelktrophorese, 3) Hämagglutinationsreaktion nach Boyden, 4) zweidimensionale Immunodiffusion nach Ouchterlony, bei 3) und 4) jeweils gegen das Vollantigen, das Schleppereiweiß und gegen den Tumorextrakt bzw. die Tumorzellen.

II) Methodik

1) Aufbereitung des Tumormaterials

a) Gewinnung des Zellfiltrates für die Bisdiazotierung und für die Transplantation

Tumorgewebe wurde von einem tumortragendem Tier nach Tötung in Äthernarkose unter Wahrung steriler Kautelen operativ entnommen, sorgfältig von peritumoralem Gewebe und Bindegewebe abpräpariert, kurzfristig in aqua dest. gewässert und sodann durch die Embryonenpresse getrieben. Das so gewonnene Zellsubstrat wurde im Verhältnis 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Ein Teil dieser Tumorzellsuspension wurde mit sterilem Injektionsbesteck in die Flankenregion der Tiere subcutan injiziert; die restliche Suspension wurde für die Sensibilisierung der Gruppe IIa verwendet (siehe auch 4a).

b) Gewinnung des Tumorhomogenates für die zweidimensionale Immunodiffusion nach Ouchterlony und für die Hämagglutinationsreaktion nach Boyden

Der kurzfristig gewässerte Tumor, der w.o. präpariert worden war, wurde grob zerkleinert, nach Zusatz von 4 Teilen physiologischer Kochsalzlösung mit dem Ultra - Turrax - Gerät ^{+) (20 000 Umdrehungen/Min)} homogenisiert. Das so gewonnene Homogenat wurde in der Kühlzentrifuge 20 Min bei 10 000 Umdrehungen/Min zentrifugiert, der Überstand wurde als Antigenlösung verwendet.

2) Aufbereitung der verschiedenen Antigensubstrate

a) Koppelung des Tumorhomogenates an menschliche O rh - negative Erythrozyten

Die Koppelung des Tumorhomogenates an die Erythro-

^{+) Janke und Kunkel KG, Fabrik chem.- phys. Apparate und Maschinen, Staufen i.Br.}

zyten erfolgte wie unter 3) beschrieben durch Behandlung der Erythrozyten mit Tanninsäure und nachfolgendem Inkubieren mit dem Tumorphomogenat. Dieses Antigen-substrat wurde den Tieren der Gruppe Ia injiziert.

b) Koppelung der Tumorzellen an Kaninchen - γ - Globulin

Die Reaktion wurde genau nach der unter 4) beschriebenen BDB - Methode durchgeführt. Dieses Antigensubstrat wurde den Tieren der Gruppe IIa injiziert.

3) Hämagglutinationsreaktion nach Boyden (1)

Die passive Hämagglutination beruht im Prinzip auf der Möglichkeit, antigen wirksame Substanzen an die Oberfläche von tannierten Erythrozyten zu adsorbieren. Die so sensibilisierten Erythrozyten gehen bei Zugabe spezifischen Immunserums eine Agglutination ein.

Ausführung:

A) Behandlung der Erythrozyten

a) Gewinnung: Menschliches O rh - negatives Blut wird unmittelbar nach der aseptischen Abnahme durch Rühren mit einem Magnetührstab ungerinnbar gemacht.

b) Waschen: Das Blut wird anschließend zentrifugiert und das überstehende Serum verworfen. Die verbleibenden Erythrozyten werden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend auf eine 2,5 %ige Suspension eingestellt.

c) Tannieren: Gleiche Teile einer frisch bereiteten Tanninsäurelösung 1 : 40 000 und der Suspension werden gemischt und 20 Min bei 37 °C inkubiert. Die Erythrozytensuspension wird dann 10 Min bei 1500 Umdrehungen/Min abzentrifugiert und nach nochmaligem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung erneut auf eine 2,5 %ige Suspension eingestellt.

d) Inkubieren mit dem Antigen: Zu der 2,5 %igen Erythrozytensuspension wird die in einem Vorversuch er-

mittelte optimale Antigenmenge (hier: Tumorextrakt) gegeben. Das Gemisch wird 20 Min bei 37 °C inkubiert. Danach wird bei 1500 Umdrehungen/Min abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit verworfen. Nach zweimaligem Waschen wird erneut eine 2,5 %ige Erythrozytensuspension eingestellt.

B) Aufbereitung des Immunserums

a) Den Versuchstieren wird Blut entnommen, dieses zentrifugiert und das überstehende Serum abpipettiert. Unspezifische Antikörper werden durch Adsorption an Hammelerythrozyten eliminiert.

b) Mit diesem Immunserum wird eine geometrische Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

C) Versetzen der geometrischen Reihe mit der tannierten und antigenbeladenen Erythrozytensuspension

Zur Titerbestimmung werden nun jeweils 0,25 ml der sensibilisierten Erythrozytensuspension zu der geometrischen Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Serums hinzugegeben.

D) Hierauf läßt man die Agglutination zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen.

E) Beurteilung

Die letzte noch eine Agglutination zeigende Verdünnung des Immunserums wird als Antikörper - Titer angegeben. Da die Methode außerordentlich empfindlich ist, müssen die Fehlermöglichkeiten durch Kontrolluntersuchungen ausgeschlossen werden.

4) BDB - Methode (9)

Bei der BDB - Technik (BDB = bisdiazotiertes Benzidin) werden mittels einer chemischen Bindung antigene Substanzen an die Oberfläche von Erythrozyten -- in unserem Versuch Tumorzellen -- gekoppelt. Erfolgt die

Koppelung an Erythrozyten, so zeigen diese nach Zugabe des Immunserrums Agglutination.

Ausführung:

a) Das unter 1a) beschriebene Tumorzellfiltrat wird mit Sörensen - Puffer dreimal gewaschen und 10 Min bei 1500 Umdrehungen/Min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und das Sediment für Lösung I verwendet (s.u.).

b) Benzidinreagenz: 0,23 g Benzidin p.a. werden in 45 ml 0,2 n HCl gelöst. 0,1765 g NaNO_2 p.a. werden in 5 ml aqua dest. gelöst. Der salzsauren Benzidinlösung wird die Natriumnitritlösung tropfenweise zugegeben, dabei durch kräftiges Schütteln gut vermischt und anschließend 30 Min bei 0 °C im Eiswasserbad stehen gelassen. Das fertige Reagenz wird in verschiedene Portionen geteilt und dann bei - 20 °C aufbewahrt. Kurz vor Herstellung des Antigenkomplexes wird jeweils eine Portion aufgetaut und für Lösung II verwendet.

c) Sörensen - Puffer: 0,15 m Na_2HPO_4 + 0,15 m KH_2PO_4 , pH 7,4.

d) Antigen: Kaninchen - γ - Globulin 1,5 g %ig (Bestimmung im Autoanalyzer).

e) Lösung I: 5 ml Antigenlösung + 10 ml Sörensen - Puffer + 0,25 ml Tumorzellsediment.

f) Lösung II: 1 ml Benzidinreagenz + 14 ml Sörensen - Puffer.

g) Zur Lösung I wird unter vorsichtigem Schütteln 0,1 ml Lösung II gegeben und das Gemisch 10 Min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugieren (w.o.) und Verwerfen des Überstandes wird dreimal mit Sörensen - Puffer gewaschen und auf 10 ml aufgefüllt.

5) Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese wurde nach den klassischen Angaben von Grassmann und Hannig vorgenommen.

men (7, 20). Im Prinzip wird so vorgegangen, daß das zu trennende Eiweißgemisch (hier das Serum der Versuchstiere) als Querstrich auf einen Filterpapierstreifen aufgetragen wird, der dann mit Puffer getränkt und in eine feuchte Kammer gebracht wird. Die Enden des Papierstreifens tauchen in Pufferbehälter an beiden Enden der Kammer. Nach Anlegen einer Gleichspannung wandern die einzelnen Komponenten mit charakteristischer Geschwindigkeit zur Anode; nach 6 - 8 Stunden ist eine ausreichende Trennung erreicht. Nach Trocknen, Färben und Transparentmachen der Streifen werden sie photometrisch ausgewertet. Man erhält auf diese Weise Kurven, die nach Planimetrieren die Werte für die einzelnen Fraktionen in relativen Prozenten ergeben.

6) Statistische Auswertung

Die papierelektrophoretisch gewonnenen Werte der Serumeiweißfraktionen wurden nach den herkömmlichen Angaben von Linder (15) statistisch berechnet, wobei es ausreichend erschien, Mittelwerte, Streubereiche und signifikante Differenzen anzugeben.

$$M = \frac{\sum x}{n} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum \Delta x}{n-1}} \quad \sigma_{\text{diff.}} = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

$$T = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_{\text{diff.}}} \quad \begin{array}{l} x = \text{Einzelbefund} \\ n = \text{Anzahl der} \\ \text{untersuchten Tiere} \end{array}$$

Abb. 2. Verwendete Formeln für die statistische Auswertung der papierelektrophoretisch ermittelten Werte für die Serumeiweißfraktionen der im Versuch stehenden Ratten.

7) Zweidimensionale Immunodiffusion nach Ouchterlony (18)

Im Prinzip handelt es sich um eine Abwandlung der eindimensionalen Doppeldiffusion mit dem Unterschied, daß die Reaktionskörper frei dem Trägermedium zugeführt werden; das Immunserum diffundiert ebenso wie das Antigen in das Agargel. Es entstehen an den Stellen optimaler Konzentration Präzipitate, die sich in Gestalt von Linien abzeichnen. Jede dieser Präzipitationslinien entspricht einem einzelnen Antigen - Antikörper - System. Nähere Ausführungen sind dem einschlägigen Schrifttum zu entnehmen.

8) Agar- und Immunoelektrophorese

Agar- und Immunoelektrophorese wurden nach den klassischen Angaben von Grabar und Williams (4, 5, 6, 22) bzw. nach der Mikromethode nach Scheidegger (19) vorgenommen. Für die Immunoelektrophorese wurden Objektträger mit je 3 ml Agar beschickt. Nach Erstarren des Agars wurden Aussparungen für die Aufnahme der zu untersuchenden Seren, sowie ein Kanal für das Antiserum gestanzt. Die Elektrophoreselaufzeit betrug 1 1/2 - 2 Stunden bei 200 V Gleichspannung und 20 mA. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die vorbereiteten Kanäle mit einem spezifischen Anti - Ratte - Serum ⁺⁾ beschickt. Nach mehrmaligem Waschen der Agarplatten in physiologischer Kochsalzlösung und anschließendem Trocknen bei 37 °C unter Filterpapier wurden die Präzipitationslinien einer Proteinfärbung unterworfen.

⁺⁾ Anti - Ratte - Serum vom Kaninchen, Behringwerke AG., Marburg - Lahn

9) Haltung und Fütterung der Tiere

Die Ratten wurden gruppenweise in Boxen zusammengesetzt und durch Ohrmarken gekennzeichnet. Die Boxen wurden jeden dritten Tag gereinigt und mit feinen Hobelspänen bestreut. Die Tiere erhielten Trockenmischfutter ⁺⁾ , das Trinkwasser wurde in Flaschen gereicht.

10) Gewinnung der Serumkontrollen

Die Tiere wurden in einem Glasbehälter, der mit äthergetränktem Zellstoff ausgelegt war, narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte durch Abschneiden der Schwanzspitze nach Verwerfen der ersten Tropfen. Das Blut wurde zentrifugiert und das überstehende Serum für die Kontrolluntersuchungen verwendet.

III) Ergebnisse

1) Verhalten der Tiere im Laufe der Behandlung

Die Ratten beider Gruppen (Ia, IIa) zeigten im Verlauf der Sensibilisierung mit den verschiedenen Antigen substraten keinen Unterschied in ihrem Verhalten gegenüber den Kontrolltieren (Gruppen Ib, IIb). Ein abweichendes Verhalten ergab sich erst nach der Tumorenokulation: Die Tumoren der Tiere aus Gruppe Ia wuchsen in gleicher Zeit und zur gleichen Größe heran (Größe eines Hühnereies) wie die Tumoren sämtlicher Kontrolltiere. Die Lebensdauer dieser Gruppen (Ia, Ib, IIb) war etwa gleich groß: 32 Tage nach der Tumortransplantation lebte keines der Tiere mehr.

Bei den Tieren der Gruppe IIa war ein deutlich langsames Tumorstadium festzustellen. Fünf Tiere zeigten ein im Vergleich mit den übrigen Tieren die-

⁺⁾ Trockenmischfutter R 16 der Fa. Altromin GmbH, Lage (Lippe)

ser Gruppe noch weiter verlangsamtes Tumorstadium. Bei diesen fünf Tieren wuchsen die Tumoren nur bis etwa Kirschgröße heran und bildeten sich dann langsam zurück. 60 Tage nach der Tumorstadiuminokulation waren bei diesen Tieren die Tumoren völlig verschwunden.

2) Papierelektrophoretische Ergebnisse

Gemessen an den statistisch ermittelten Befunden waren die Serumeiweißrelationen sämtlicher Tiere vor Behandlungsbeginn im Bereich der Norm gelegen. Im Verlaufe der Behandlung, d.h. unter Sensibilisierung mit abgeänderten Tumorstadiumsubstrat und nachfolgender Tumorstadiuminokulation konnten in Gruppe Ia folgende Veränderungen unter den Serumeiweißkörpern wahrgenommen werden: Von der 1. Kontrolle an kam es bis zur letzten Blutabnahme (Endwert) zu einer kontinuierlichen Abnahme des Albumins und zu einer relativen Vermehrung zunächst vor allem der β - und γ - Globulinfraktionen. Mit letzter Kontrolle zeigten auch die α_2 - Globuline eine relative Vermehrung. In Diskrepanz zu den bis zur 2. Kontrolle allenthalben faßbaren Anstiegen der Globulinfraktionen war ab 2. Kontrolle ein von da an kontinuierlicher Rückgang der β - und γ - Globulinfraktionen nachweisbar, so daß die Endwerte der Serumeiweißkörper im wesentlichen folgende Konstellation aufwiesen: Starke Hypalbuminämie mit relativer α_1 -, α_2 - und α_2/β - Anreicherung sowie bemerkenswerte Verminderung der β - und γ - Globuline, hier im Vergleich zur 1. und 2. Kontrolle (Abb. 3, Abb. 4). Signifikant waren vor allem die Unterschiede zwischen den Ausgangs- und Endwerten in der Albumin- und α_2 - Globulinfraktion (Tab. 1).

In der Gruppe Ib (Kontrolltiere) war der steile Abfall der Albumine bei 1. Kontrolle bemerkenswert, während der Endwert nahezu wieder Normalwerte zeigte.

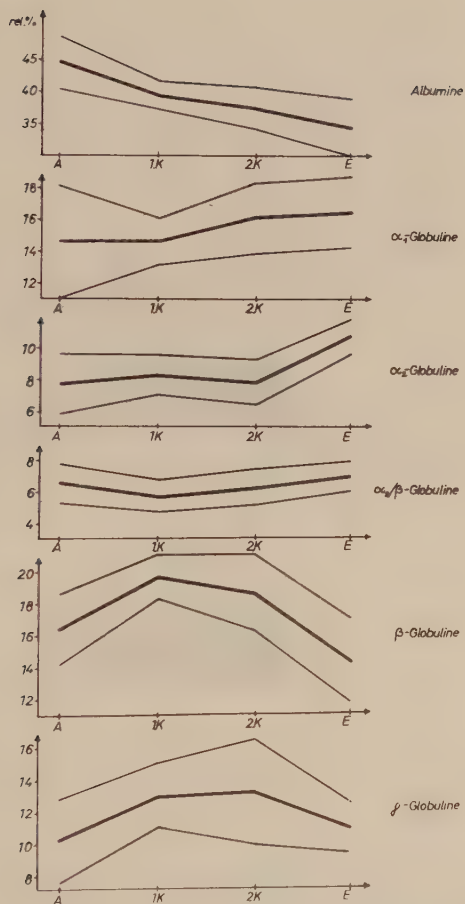


Abb. 3. Graphische Darstellung des Verhaltens der einzelnen Serumweißfraktionen in Gruppe Ia.

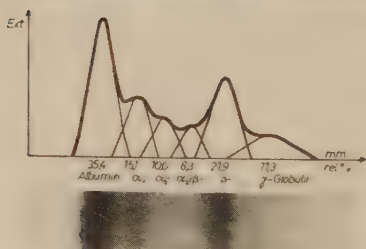
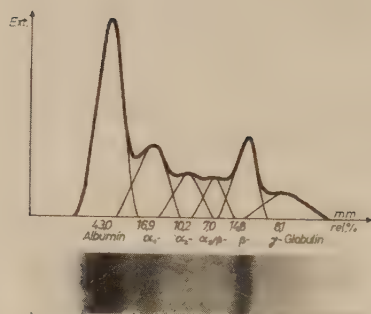


Abb. 4. Gradientenkurven der Papierelektrophoresen vor und am Ende der Behandlung; Beispiel aus Gruppe Ia.

Gruppe Ia		Albumin	Globuline					
			α_1	α_2	α_2/β	β	γ	
A	M	44,60	14,56	7,86	6,42	16,33	10,77	rel. %
	$\sigma \pm$	4,38	3,56	1,67	1,27	2,32	2,58	rel. %
E	M	34,47	16,72	10,37	6,93	14,38	10,93	rel. %
	$\sigma \pm$	4,75	2,12	1,21	0,99	2,85	1,74	rel. %
	T	7,20	2,33	6,52	1,42	1,95	1,09	

Tab. 1. Statistisch berechnete Befunde zum Verhalten der Serumeiweißkörper in Versuchsgruppe Ia. Die schraffiert eingerahmten Zahlen bedeuten signifikante Differenzen zwischen den entsprechenden Vergleichswerten (A = Ausgangswert; E = Endwert).

Gruppe Ib		Albumin	Globuline					
			α_1	α_2	α_2/β	β	γ	
A	M	45,88	12,67	6,53	4,54	17,83	12,53	rel. %
	$\sigma \pm$	3,01	1,88	0,80	0,87	2,56	1,76	rel. %
E	M	44,30	13,79	6,57	5,12	18,95	11,47	rel. %
	$\sigma \pm$	2,07	0,94	0,68	1,37	1,44	1,62	rel. %
	T	1,38	1,68	0,12	1,13	1,20	1,40	

Tab. 2. Statistisch berechnete Befunde zum Verhalten der Serumeiweißkörper in Versuchsgruppe Ib.

Unter den Globulinfraktionen waren, abgesehen von einem geringfügigen Anstieg bei 1. Kontrolle keine nennenswerten Verschiebungen wahrzunehmen (Abb. 5). Signifikante Unterschiede ließen sich hier in keinem Fall nachweisen (Tab. 2).

Folgende Veränderungen unter den Serumeiweißkörpern konnten in Gruppe IIa erhoben werden: Auch hier trat eine kontinuierliche Abnahme der Albumine von der 1. Kontrolle bis zum Endwert auf, bei einer relativen Vermehrung zunächst der α_2 -, α_2/β - und γ -Globulinfraktionen. Mit 3. Kontrolle zeigten auch die α_1 - und β -Globuline einen deutlichen Anstieg. Die Endwerte wiesen folgende Konstellation auf: Starke Hypalbuminämie mit relativer Anreicherung sämtlicher Globulinfraktionen (Abb. 6, Abb. 7). Signifikant waren hier vor allem die Unterschiede zwischen den Ausgangs- und Endwerten der Albumine und der α_2 -, α_2/β - und γ -Globulinfraktionen (Tab. 3). Interessant war das Verhalten der Serumeiweißkörper bei den überlebenden Tieren der Gruppe IIa: Unter der immunologischen Behandlung kam es zunächst zu einer deutlichen Dysproteinämie mit starker Hypalbuminämie und relativer Vermehrung vor allem von α - und β -Globulinen. Später ergab sich eine Verschiebung der Serumeiweißrelationen wieder in Richtung der normalen Verteilung (Abb. 8). Die Endwerte zeigten eine noch starke Hypalbuminämie, eine geringfügige relative Vermehrung der α - und β -Globuline, während die γ -Globulinfraktion einen steilen Anstieg aufwies (Abb. 6, Abb. 8). Signifikante Unterschiede konnten allerdings nicht festgestellt werden (Tab. 4, Tab. 5).

Nur leichte Verschiebungen in ihren Serumeiweißrelationen wies die Gruppe IIb (Kontrolltiere) auf: Von der 1. Kontrolle bis zum Endwert kam es auch hier zu einem kontinuierlichen, aber nur leichten Absinken

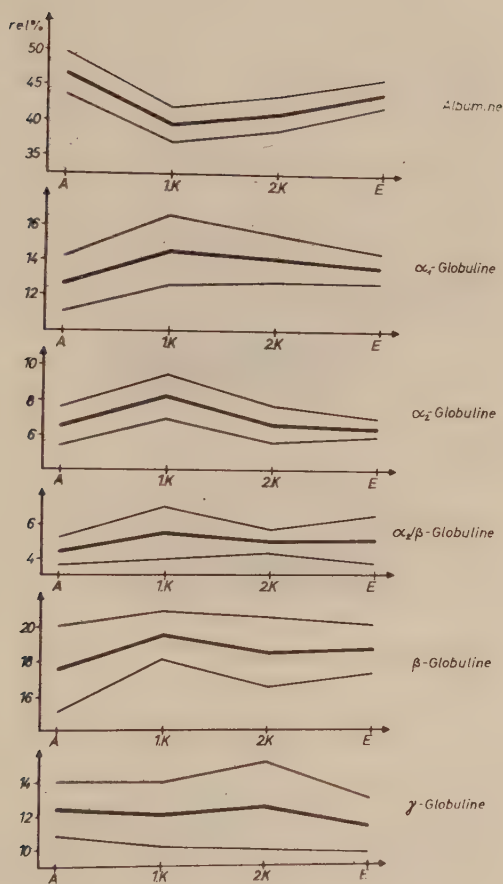


Abb. 5. Graphische Darstellung des Verhaltens der einzelnen Serumeiweißfraktionen in Gruppe Ib.

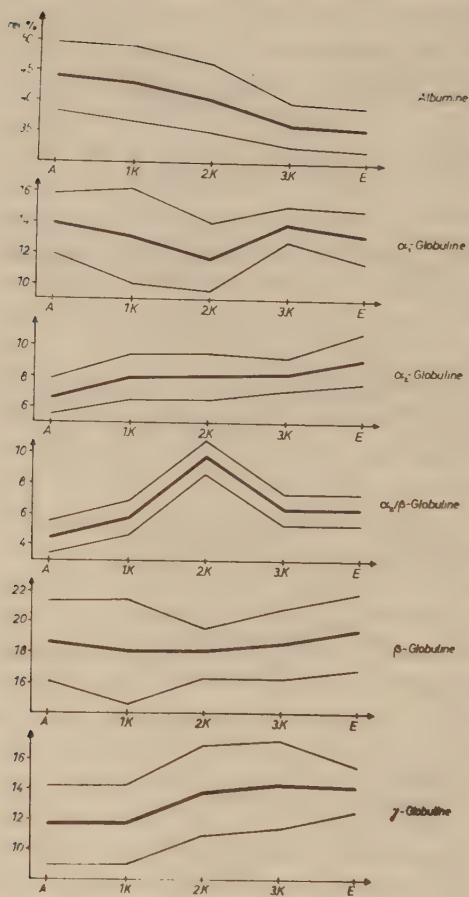


Abb. 6. Graphische Darstellung des Verhaltens der einzelnen Serumweißfraktionen in Gruppe IIa.

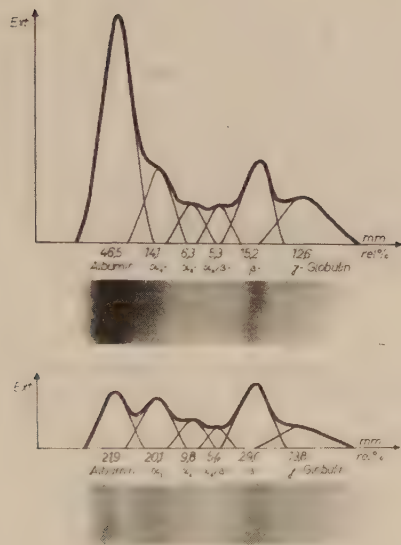


Abb. 7. Gradientenkurven der Papierelektrophoresen vor und am Ende der Behandlung; Beispiel aus Gruppe IIa.

Gruppe IIa		Albumin	Globuline					
			α_1	α_2	α_2/β	β	γ	
A	M	44,13	14,17	6,68	4,50	18,90	11,59	rel. %
	G:	5,60	1,99	1,24	1,12	2,82	2,71	rel. %
E	M	36,20	14,37	9,23	6,53	19,54	14,23	rel. %
	G:	3,46	1,79	1,72	1,12	2,47	2,56	rel. %
	T	5,39	0,35	5,39	5,71	0,76	4,36	

Tab. 3. Statistisch berechnete Befunde zum Verhalten der Serumeiweißkörper in Versuchsgruppe IIa.

Gruppe IIa'		Albumin	Globuline					
			α_1	α_2	α_2/β	β	γ	
A'	M	47,62	13,58	7,26	4,36	17,14	10,04	rel. %
	G:	7,78	2,81	1,43	0,38	3,45	2,02	rel. %
E'	M	35,86	14,70	7,64	5,98	18,82	16,92	rel. %
	G:	5,29	1,79	0,84	1,90	2,18	2,62	rel. %
	T	4,42	0,75	0,51	1,62	0,91	4,68	

Tab. 4. Statistisch berechnete Befunde zum Verhalten der Serumeiweißkörper in Versuchsgruppe IIa' (überlebende Tiere).

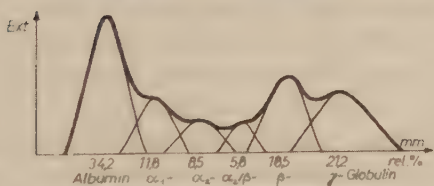
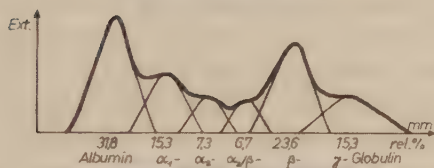
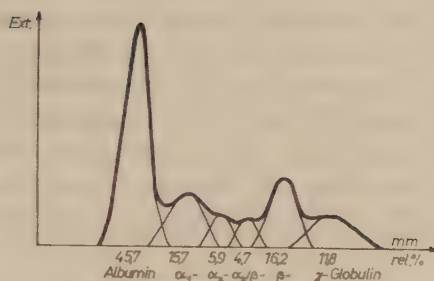


Abb. 8. Diagramme und Papierstreifen der elektrophoretischen Analysen des Serums eines unter der immunologischen Behandlung genesenen Versuchstieres. Oben normale Relation der Serumeiweißkörper (Ausgangswert), Mitte deutliche Dysproteinämie mit Hypalbuminämie und relativer Vermehrung vor allem von α - und β -Globulinen, unten Verschiebung der Serumeiweißrelationen wieder in Richtung der normalen Verteilung.

der Albumine, während die α_2 -, α_2/β - und γ - Globulinfraktionen eine relative Anreicherung zeigten. Bemerkenswert war ein kontinuierlicher Abfall der β - Globuline vom Ausgangswert bis zur 2. Kontrolle; trotz des folgenden Anstieges wurde der ursprüngliche Wert nicht mehr erreicht (Abb. 9). Signifikante Unterschiede ließen sich zwischen den Ausgangs- und Endwerten der α_2 - und α_2/β - Globulinfraktionen nachweisen (Tab. 6).

3) Ergebnisse der Hämagglutination nach Boyden und der Präzipitation nach Ouchterlony

In Gruppe Ia war bei Prüfung vor Versuchsbeginn bei keinem der Seren ein positiver Agglutinationstiter nachweisbar. Dies gilt sowohl für die Reaktion der Humanerythrozyten der Gruppe O rh - negativ, als auch für die Reaktion des Komplexes von Erythrozyten und Tumorphomogenat und von Erythrozyten und Kaninchen - γ - Globulin. Auch der Ouchterlonytest im Agar-gel erbrachte bei gleicher Versuchsanordnung keine positiven Reaktionen. Bei 1. Kontrolle konnten mit keinem der verwendeten Antigen-systeme agglutinierende oder präzipitierende zirkulierende Antikörper nachgewiesen werden. Erst bei 2. Kontrolle, d.h. 17 Tage nach Versuchsbeginn, waren im Hämagglutinationstest mit der Erythrozytensuspension Titer bis zu 1:256, mit der Erythrozyten - Tumor - Suspension Titer bis zu 1:512 nachweisbar. Auffallend war bei sämtlichen dieser Hämagglutinationen die Tatsache, daß zu Beginn der Verdünnungsreihen bis zu Verdünnungen von 1:64 Hemmzonen auftraten.

Mit der Präzipitationstechnik konnten sowohl unter Verwendung der Erythrozytensuspension als auch unter Verwendung des Erythrozyten - Tumor - Komplexes ein bis zwei Präzipitationslinien nachgewiesen werden,

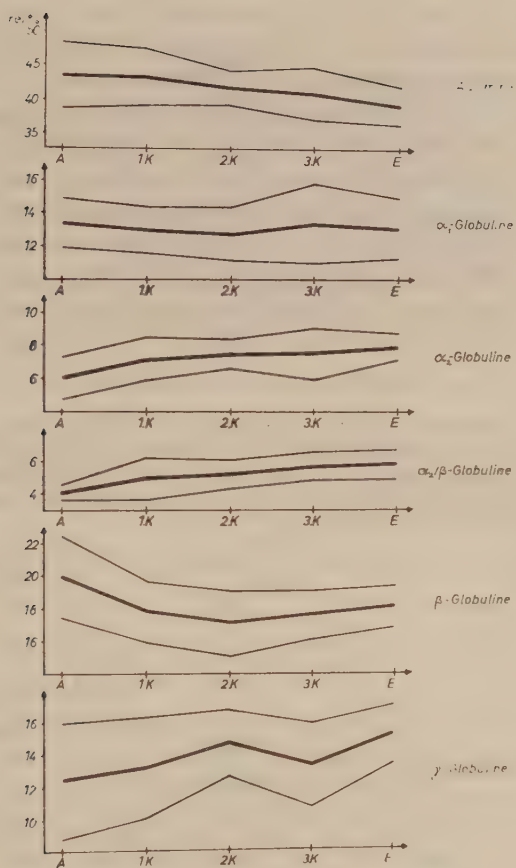


Abb. 9. Graphische Darstellung des Verhaltens der einzelnen Serumeiweißfraktionen in Gruppe IIb.

Gruppe IIa ⁺		Albumin	Globuline					
			α_1	α_2	α_2/β	β	γ	
E	M	36,20	14,37	9,23	6,53	19,54	14,23	rel. %
	G $\pm$	3,46	1,79	1,72	1,12	2,47	2,56	rel. %
E ⁺	M	35,86	14,70	7,64	5,98	18,82	16,92	rel. %
	G $\pm$	5,29	1,79	0,84	1,90	2,18	2,62	rel. %
	T	0,33	0,36	2,96	0,47	0,65	2,06	

Tab. 5. Statistisch berechnete Befunde zum Verhalten der Serumeiweißkörper in Versuchsgruppe IIa⁺; Vergleich der Endwerte der nach der Tumornokulation eingegangenen Tiere (E) mit den Endwerten der überlebenden Tiere (E⁺).

Gruppe IIb		Albumin	Globuline					
			α_1	α_2	α_2/β	β	γ	
A	M	43,81	13,43	6,07	4,13	20,04	12,51	rel. %
	G $\pm$	5,00	1,67	1,19	0,52	2,48	3,78	rel. %
E	M	39,34	13,18	8,05	5,97	18,14	15,29	rel. %
	G $\pm$	2,92	1,91	0,84	0,92	1,30	1,79	rel. %
	T	2,44	3,12	4,31	5,50	2,14	2,10	

Tab. 6. Statistisch berechnete Befunde zum Verhalten der Serumeiweißkörper in Versuchsgruppe IIb.

nicht aber bei Verwendung des Tumorhomogenates allein. Bei letzter Kontrolle konnten mit der Boydenteknik unter Verwendung der Erythrozytensuspension positive Agglutinationsreaktionen bis zu einem Titer von 1:32, unter Verwendung des Erythrozyten - Tumor - Komplexes Titer bis zu 1:228 nachgewiesen werden. In diesen Fällen trat das Phänomen der Hemmzone nicht auf. Präzipitierende Antikörper, wie sie im Ouchterlonytest geprüft werden, waren zu diesem Zeitpunkt gegen sämtliche verwendeten Antigene festzustellen. Es ergaben sich jeweils ein bis drei mehr oder weniger scharf begrenzte Präzipitationslinien (Tab. 7, Abb. 10).

Gruppe Ia	passive Hämagglutination gegen		Präzipitation gegen		
	Ery	Tu	Ery	Tu	Ery+Tu
Ausgangswert	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1. Kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
2. Kontrolle	1:256 (Hemmzone)	1:512 (Hemmzone)	+	Ø	+
Endwert	1 : 32	1:128	+	+	+

Tab. 7. Ergebnisse der passiven Hämagglutination und der Präzipitationsreaktion im Agargel für Versuchsgruppe Ia. Ery = Erythrozytensuspension; Tu = Tumorumogenat.



Abb. 10. Ergebnis der zweidimensionalen Immunodiffusion im Agargel bei Ansatz einer Erythrozytensuspension (als Antigen) gegen das Serum eines sensibilisierten Tieres (Immuns serum = SE). ARS = Anti - Ratte - Serum.

In Gruppe IIa waren zirkulierende Antikörper in den Ausgangsseren weder mit der passiven Hämagglutination noch mit der zweidimensionalen Immunodiffusion zu erfassen; dies gilt selbstverständlich wieder für alle verwendeten Antigene. Auch bei 1. und 2. Kontrolle waren in den Seren mit keinem der Antigene und mit keiner der Antikörperrnachweistechiken zirkulierende Antikörper nachzuweisen. Erst bei 3. Kontrolle ergaben sich mit der Boydentechnik unter Verwendung sowohl des Erythrozyten - Tumor - Komplexes als auch unter Verwendung des Erythrozyten - γ - Globulinkomplexes positive Agglutinationsreaktionen mit einem Titer bis zu 1:1024, wobei in der Gruppe mit dem Erythrozyten - Tumor - Komplex wiederum eine Hemmzone, hier bis zu einer Verdünnung von 1:128 auffiel. Bei letzter Kontrolle waren die Titer wesentlich zurückgegangen: Bei Verwendung des Erythrozyten - Tumor - Kom-

plexes auf eine Titerstufe von 1:16 und bei Verwendung des Erythrozyten - γ - Globulinkomplexes auf 1:64. Mit dem Ouchterlonytest konnten präzipitierende Antikörper gegen sämtliche verwendeten Antigene ebenfalls erst bei 3. Kontrolle nachgewiesen werden. Der gleiche Befund ergab sich in unverminderter Intensität auch bei letzter Kontrolle (Tab. 8, Abb. 11, Abb. 12).

Gruppe IIa	passive Hämagglutination gegen		Präzipitation gegen		
	Tu	γ	γ	Tu	Tu + γ
Ausgangswert	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1. Kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
2. Kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
3. Kontrolle	1:1024 (Hemmzone)	1:2048 (Hemmzone)	+	+	+
Endwert	1:32	1:128	+	+	+

Tab. 8. Ergebnisse der passiven Hämagglutination und der Präzipitationsreaktion im Agargel für Versuchsgruppe IIa. γ = Kaninchen - γ - Globulin; Tu = Tumorphomogenat.



Abb. 11. Ergebnis der zweidimensionalen Immunodiffusion im Agargel bei Ansatz des Kaninchen- γ -Globulin (als Antigen) gegen das Serum eines sensibilisierten Tieres (SE). ARS = Anti - Ratte - Serum.

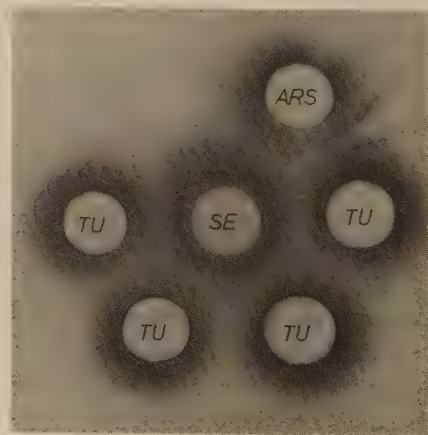


Abb. 12. Ergebnis der zweidimensionalen Immunodiffusion im Agargel bei Ansatz des Tumorphomogenates (als Antigen) gegen das Serum eines sensibilisierten Tieres (SE).

4) Agar- und immunoelektrophoretische Ergebnisse

Die agarelektrophoretischen Befunde stimmen in etwa mit den Ergebnissen der Papierelektrophorese überein. Als Besonderheit konnte der allerdings physiologische Lipidreichtum (Abb. 13) des Rattenserums aufgezeigt werden, der unter der Behandlung in den verschiedenen Versuchsgruppen nicht nennenswert beeinflußt wurde.



Abb. 13. Agar- und Immunoelektrophorese mit Protein- und Lipoproteidfärbung des Serums einer unbehandelten Albinoratte.

Die immunoelektrophoretischen Befunde ließen mit Bezug auf die bessere Differenzierung der Serumweißkörper unter den verschiedenen Versuchsbedingungen keine qualitativen Auffälligkeiten erkennen. Unter Berücksichtigung der semiquantitativ faßbaren Immunopräzipitate waren im wesentlichen die papierelektrophoretisch gebotenen Relationsverschiebungen

zu bestätigen. Paraproteine bzw. atypische Präzipitationsphänomene konnten für keine der darstellbaren Serumeiweißkörper der Ratte nachgewiesen werden.

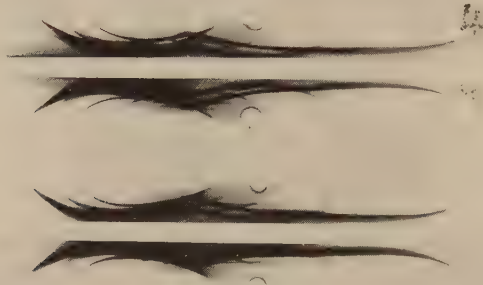


Abb. 14. Immunelektrophoretische Befunde der Seren verschiedener Versuchstiere am Ende der Beobachtungszeit.

Immunologisch verursachte Wachstumshemmung tiertrans-
plantabler Tumoren

IV) Diskussion

In vorliegenden Untersuchungsreihen sollte geprüft werden, inwieweit die Proteine rattentransplantabler Tumoren durch Koppelung an heterologe Eiweißkörper eine Sensibilisierung der Ratte zu induzieren und damit eine Reaktivitätsänderung gegenüber dem vormals transplantablen Tumor i.S. einer Autoaggression bzw. Transplantationsreaktion zu bewirken vermögen. Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß Tumorzellen eines transplantablen Tumors, die, wie in Vorversuchen festgestellt werden konnte, als solche keine sensibilisierende Wirkung im Empfängerorganismus entfalten (8, 10, 13, 21), durch Koppelung an spezieisfremde Proteine eine Antikörperproduktion sowohl gegen die heterologe Substanz als auch nunmehr gegen die transplantablen Tumorzellen hervorrufen (2). Dabei haben die Tiere, die mit einem heterologen γ - Globulin - Tumorzell - Komplex behandelt wurden, den wesentlich günstigeren Effekt gezeigt, als die Tiere, die mit einem Erythrozyten - Tumorprotein - Komplex behandelt wurden. Die unterschiedliche Wirkungsweise ist u.E. damit zu erklären, daß im einen Fall Tumorzell f i l t r a t , d.h. intakte Tumorzellen, mit dem antigen hochwirksamen γ - Globulin zur Wirkung kam, während im anderen Falle Tumor h o m o g e n a t , d.h. lösliche Proteine der Tumorzellen, an Erythrozyten fixiert, die Sensibilisierung der Tiere verursachten.

In beiden Gruppen konnten zwar unter anderem spezifische, zirkulierende Antikörper gegen Tumorproteine nachgewiesen werden, wirksam war offenbar aber nur der Sensibilisierungsmodus der Gruppe 11a. Hier kam es zu

Befunden und Phänomenen, die i.S. eines Transplantat-abstoßungsmechanismus zu deuten sind. Hier scheinen m.a.W. die immunologisch kompetenten Gewebslymphozyten die dominierende Rolle in dem induzierten Abwehr-geschehen übernommen zu haben.

Mit Bezug auf die Erfolgsquote der Behandlung, d.h. die Zahl der Rückbildungen und völligen Heilungen, ist zu bedenken, daß sicher einige Tiere für die exakte Gewinnung der Endwerte vorzeitig aus der Beobachtung genommen wurden.

Die Endwerte wurden durch völliges Entbluten der Tiere gewonnen, wobei sich der Zeitpunkt der letzten Blutabnahme nach dem Allgemeinzustand der Tiere richtete. Demnach ist es möglich, daß sich bei dem einen oder anderem Tier noch eine Remission angebahnt hätte.

Erst weitere Untersuchungen mit ergänzenden spezifischen immunologischen Nachweismethoden, etwa Lymphozytenübertragungsversuchen (Übertragung spezifisch sensibilisierter Lymphozyten) bzw. Parabioseversuchen zwischen sensibilisierten und nicht behandelten Tieren, sowie der Lymphozytentransformationstest werden eine Erklärung für die vorliegenden Beobachtungstatsachen ermöglichen.

Es besteht jedoch kaum Zweifel darüber, daß in den beiden unterschiedlich behandelten Versuchstiergruppen eine unterschiedliche immunologische Reaktivität vorgelegen haben muß. Dies wird u.a. auch durch das unterschiedliche Verhalten der Serumeiweißkörper bekräftigt, wobei in der Gruppe der mit Tumor- γ -Globulin behandelten Tiere offensichtlich eine wesentlich stärkere allgemeine immunologische Abwehrreaktion in Gang gebracht wurde. Das unterschiedliche Verhalten

der Tiere der verschiedenen Gruppen ist demzufolge in einer unterschiedlichen relativen Antigenität der angewandten Komplexe gegenüber der gewählten Tierspezies zu sehen.

V) Zusammenfassung

In vorliegenden Untersuchungsreihen wurde geprüft, inwieweit die Proteine rattentransplantabler Tumoren durch Koppelung an heterologe Proteine bzw. Proteinsysteme eine Sensibilisierung der Ratte verursachen und damit eine Reaktivitätsänderung gegenüber dem vormals transplantablen Tumor bewirken können. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß in allen Fällen spezifische zirkulierende Antikörper gegen Tumorproteine gebildet wurden. Der günstigste Effekt im Hinblick auf eine Transplantatabstoßung wurde erreicht mit der Koppelung von Tumorzellen an Kaninchen- γ -Globulin. Bei den Tieren, die mit einem solchen Komplex behandelt wurden, kam es bei 25 % der Versuchstiere zu einer völligen Rückbildung der zunächst angegangenen Transplantate. Papier- und immunoelektrophoretisch konnte eine tiefgreifende Dysproteinämie aufgezeigt werden, die in den genannten, immunologisch beeinflussten Fällen eine deutliche Relationsänderung in Richtung der Normalverteilung der Serumweißkörper erkennen ließen. Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung des einschlägigen Schrifttums diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BOYDEN, S.V.:

The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.

J. exp. Med. 93, 107 (1951)

2. CZAJKOWSKI, N.P., M. ROSENBLATT, P.L. WOLF und J. VAZQUEZ:

A new method of active immunisation to autologous human tumour tissue.

Lancet, II, 905 (1967)

3. FUJIWARA, M. und T. NATATA:

Induction of tumour immunity with tumour cells treated with extract of garlic (*Allium sativum*).

Nature (Lond.) 216, 83 (1967)

4. GÖTZ, H., G. BERG und F. SCHEIFFARTH:

Methodische Grundlagen der Immunoelktrophorese.

Z. Immun.-forsch. 114, 72-84 (1954)

5. GRABAR, P. und P. BURTIN:

Analyse immuno-électrophorétique. Application avec liquides biologiques humains.

Masson et Cie, Paris (1960)

6. GRABAR, P. und C.A. WILLIAMS:

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines; application au serum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta 10, 193 (1956)

7. GRASSMANN, W. und K. HANNIG:

Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier.

Dtsch. Med. Wschr. 76, 333 (1951)

8. GÜNTHER, K.:

Serologische und fluoreszenzoptische Untersuchungen an tumortragenden Ratten (Transplantation von Yoshida-Tumoren).

Diss. Erlangen (1967)

9. HENNING, N.:

Klinische Laboratoriumsdiagnostik, 3. Aufl.

Urban und Schwarzenberg, München-Berlin (1966)

10. KLOBE, U.:

Serologische und fluoreszenzoptische Untersuchungen an tumortragenden Ratten (Transplantation von Walker-Tumoren).

Diss. Erlangen (1967)

11. KOSOWER, E.M.:

The therapeutic possibilities arising from the chemical modification of proteins.

Proc. N.A.S. 53, 897-901 (1965)

12. LANDSTEINER, K. und M.W. CHASE:

Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple components.

Proc. Soc. exper. Biol. 49, 688 (1942)

13. LEHR, E.:

Tierexperimentelle Studien zur Isosensibilisierung von Tumorproteinen (Versuche an ein und demselben Tierstamm).

Diss. Erlangen (1968)

14. LEYDEN von, E. und F. BLUMENTHAL:

Vorläufige Mittheilungen über einige Ergebnisse der Krebsforschung auf der I. medizinischen Klinik.

Dtsch. Med. Wschr. 36, 637 (1902)

15. LINDER, A.:

Statistische Methoden für Mediziner, Naturwissenschaftler und Ingenieure.

Birkhäuser-Verlag, Basel (1964)

16. MUNDHENKE, U.:

Tierexperimentelle Studien zur Isosensibilisierung von Tumorproteinen (Versuche an zwei Tierstämmen).

Diss. Erlangen (1968)

17. NADLER, S. und G.E. MOORE:

a) Immunologische Krebstherapie.

Dtsch. Ärzteblatt 3 (1966)

b) Surgical Forum 26, 229 (1965)

c) Ann. Surgery 164, 482 (1966)

18. OUCHTERLONY, Ö.:

a) Diffusion-in-gel methods for immunological analyses.

Progr. Allergy 5, 1-78 (1958)

b) Gel-Diffusion techniques.

15. Colloquium d. Ges. für Physiol. Chemie in Mosbach/Baden

13-35 (1965) Springer, Berlin-Heidelberg-New York

19. SCHEIDEGGER, J.J.:

Une microméthode d'immuno-électrophorèse.

Int. Arch. Allergy 7

20. SCHEIFFARTH, F., G. BERG und H. GÖTZ:

Papierelektrophorese in Klinik und Praxis.

Urban und Schwarzenberg, München-Berlin (1962)

21. SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ, H. GÖTZ
und M. ROHRWASSER:
Immunologische Studien am Walker-Carcinom
und Yoshida-Sarkom.
Z. Krebsforsch. 70, 178 (1967)
22. WILLIAMS, C.A. und P. GRABAR:
a) Immuno-electrophoretic studies on serum
proteins.
I. The antigens of human serum.
J. Immunol. 74, 158 (1955)
b) Immuno-electrophoretic studies on serum
proteins.
II. Immunsera: Antibody distribution.
J. Immunol. 74, 397 (1955)

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Herrn Prof. Dr. med. F. Scheiffarth für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates herzlich zu danken.

Darüber hinaus möchte ich Frau Privatdozentin Dr. med. H. Götz, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, meinen Dank aussprechen.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Pfarrers Friedrich Schöffthaler und seiner Ehefrau Toni, geb. Martin wurde ich am 12. September 1941 in Neumarkt in der Oberpfalz geboren. 1947 kam ich in die Volksschule in Bachhausen. Als mein Vater 1950 nach Weimersheim berufen wurde, wechselte ich in die dortige Volksschule über. Anschließend besuchte ich das Gymnasium in Weißenburg. Auch nach der Berufung meines Vaters nach Georgensgmünd im Jahre 1959 blieb ich an dieser Schule und unterzog mich dort 1962 der Reifeprüfung.

Im November 1962 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen. Das Vorphysikum legte ich im März 1964 ab, das Physikum im August 1965.

Am 2. Juni 1966 heiratete ich in Schwabach die Katechetin Christa Hensel.

Ronald Schöffthaler



LUDWIG MOLLER
BUCH- UND FOTODRUCK
ERLANGEN · FAHRSTR. 5